

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. Hans-Joachim Dulce

DIE WIRKUNG VON TRENIMON
AUF DIE EINZELNEN PHASEN
DES GENERATIONSZYKLUS EINER TURMORZELLINIE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Theresia Jungwirth
aus Bretten/Baden

1976

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. Hans-Joachim Dulce

Die Wirkung von Trenimon auf die
einzelnen Phasen des Generationszyklus einer Tumorzelllinie

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jungwirth, Theresia,
geboren in Bretten/Baden.

Referent: Prof. Dr. E. Liß

Koreferent: Prof. Dr. D. Neubert

o für



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 12. 1. 1976

Herrn Prof. Liß danke ich für die Überlassung des Themas und für die vielen Ratschläge und Anregungen bei der Erstellung der Arbeit.

Herrn Privatdozenten Dr. R. Averdunk möchte ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Gewebekulturlabor, die Anleitung und Unterstützung bei den Experimenten und anregende Diskussionen, ganz besonders danken.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

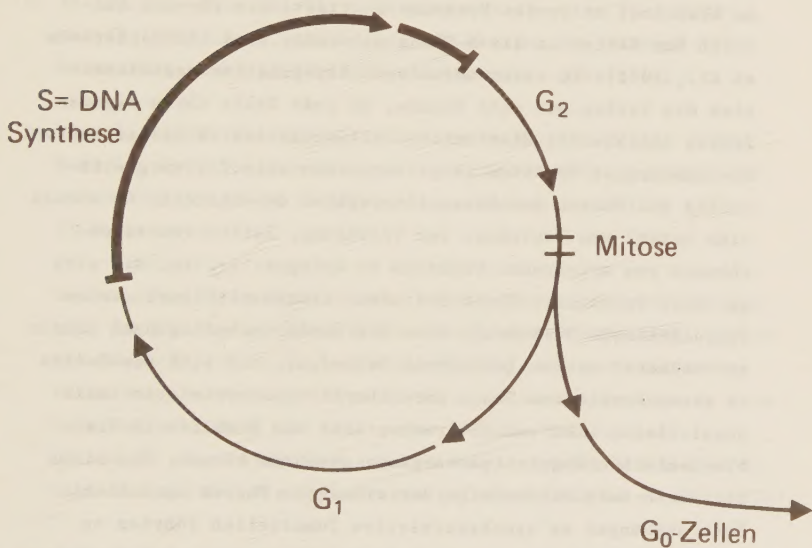
<u>E i n l e i t u n g</u>	S. 1
<u>M a t e r i a l u n d M e t h o d e n</u>	S. 5
1. Zellzüchtung	S. 5
2. Tierversuche	S. 7
3. Autoradiographie	S. 7
4. Synchronisationsverfahren	S. 8
<u>E r g e b n i s s e</u>	S. 9
<u>Versuche zur Charakterisierung in der Kultur wachsender Yoshida-Zellen</u>	S. 9
<u>Versuche zur Synchronisation der Zellen</u>	S. 10
1. mit TdR	S. 10
2. mit FUDR	S. 12
3. auf einem Ficoll-Dichtegradienten	S. 14
<u>Versuche zur Ermittlung der Trenimonwirkung</u>	S. 15
auf asynchron wachsende Zellen	S. 15
auf einzelne Phasen chemisch synchronisierter Zellen	S. 16
1. Trenimonwirkung auf Zellen der S-Phase	S. 16
2. Trenimonwirkung auf Zellen der G_2 -Phase	S. 18
3. Trenimonwirkung auf Zellen der G_1 -Phase	S. 19
4. Trenimonwirkung auf Zellen der G_1 /S-Grenze	S. 20
auf Zellen, die durch einen Ficoll-Dichtegradienten synchronisiert wurden	S. 21
<u>D i s k u s s i o n</u>	S. 21
I. Synchronisationsverfahren	S. 21
II. Wirkung von Trenimon auf bestimmte Phasen	S. 24
<u>Z u s a m m e n f a s s u n g</u>	S. 27
<u>L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s</u>	S. 28

Die Wirkung von Trenimon auf die einzelnen
Phasen des Generationszyklus einer Tumorzelllinie

Einleitung

Unter dem Generationszyklus von Zellen wird die Zeitspanne zwischen zwei Teilungen verstanden (Howard 1953). Es folgen 4 Phasen aufeinander:

Abb. 1



1. die Mitosephase M, also das morphologisch sichtbare Stadium der Zellteilung, in der sich Pro-, Meta-, Ana- und Telophase unterscheiden lassen;
2. die postmitotische Phase G₁, in der die DNS-Menge im Zellkern konstant bleibt;

3. die Phase der DNS-Synthese S, in der eine Verdoppelung der DNS stattfindet;

4. die praemitotische Phase G_2 , die Zeitspanne zwischen dem Ende der DNS-Synthese und dem Beginn der Teilung.

Die Protein-, RNS- und Lipoidsynthese ist in allen Phasen in unterschiedlicher Intensität nachweisbar (Warmsley und Pasternak, 1970). In der G_1 -Phase ist die Proteinsynthese am höchsten; es werden Proteine gebildet, die für den Eintritt der Zellen in die S-Phase notwendig sind (Schneidermann et al., 1971). In einer normalen Zellpopulation verteilen sich die Zellen auf alle Phasen, da jede Zelle ihren eigenen Zyklus durchläuft. Eine solche Zellpopulation wächst asynchron. Ein synchrones Wachstum liegt vor, wenn alle Zellen gleichzeitig die Phasen des Generationszyklus durchlaufen. Es stehen eine Anzahl von Verfahren zur Verfügung, Zellen vom asynchronen zum synchronen Wachstum zu bringen: Zellen, die sich in einer bestimmten Phase befinden, können selektiert werden (physikalische Methoden), oder die Wachstumsbedingungen können so verändert werden (chemische Methoden), daß sich die Zellen in einer bestimmten Phase anreichern. Synchronisierte Zellpopulationen sind von Interesse, weil sie Einblick in die biochemischen Regulationsvorgänge gewähren können, die diese geordnete Aufeinanderfolge der einzelnen Phasen verursacht. Untersuchungen an synchronisierten Tumorzellen führten zu der Beobachtung, daß einzelne Phasen therapeutisch besonders zu beeinflussen sind. So geht aus Versuchsserien von Sinclair hervor, daß Zellen an der G_1 /S-Grenze besonders empfindlich sind gegen Röntgenstrahlen (Sinclair u. Morton, 1965). Andere Untersucher fanden die G_2 -Phase besonders strahlenempfindlich (Erikson u. Szybalski, 1963; Nitze u. Rosemann, 1969; Terasima u. Tolmach, 1963; Mauro u. Elkind, 1968). Auch von einigen Cytostatika wurde eine phasenselektive Wirkung beschrieben (Bhuyan et al., 1972 u. 1973; Bruce et al., 1966;

Klein et al., 1970, 1971 u. 1972; Mauro u. Madoc-Jones, 1970; van Putten et al., 1972; Lampkin et al., 1969).

Nach Bruce (Bruce et al., 1966) können chemotherapeutisch wirksame Cytostatika in drei Gruppen eingeteilt werden:

1. Mittel, die Zellen in allen Teilen des Generationszyklus zerstören; die Empfindlichkeit der Zellen ist unabhängig vom Proliferationsstadium (Stickstoff-Lost-Verbindungen),
2. Mittel, die eine selektive Wirkung auf einzelne Phasen zeigen (Vinblastin, Amethopterin); Zellen, die während der Behandlung nicht in diese Phase eintreten, überleben,
3. Mittel, die Zellen in allen oder in fast allen Teilen des Generationszyklus zerstören; die Empfindlichkeit gegenüber dem Mittel hängt vom Proliferationsstadium der Zellen ab (5-Fluorouracil).

Bruce ordnet die alkylierenden Substanzen in die erste Gruppe ein. Im Widerspruch dazu sollen alkylierende Substanzen jedoch besonders wirksam sein, wenn sie Zellen in einer bestimmten Phase des Generationszyklus treffen. So wurde vom Endoxan eine verstärkte Wirkung auf Zellen der S-Phase beschrieben (Klein et al., 1970). Von anderen alkylierenden Mitteln wurde eine Wirkung auf die G_1/S -Grenze gefunden (Bhuyan et al., 1972).

Bei der Therapie von Tumoren beim Menschen ist die Frage, ob ein Cytostatikum selektiv auf Zellen einer Phase des Generationszyklus wirkt, deshalb wichtig, weil es sinnvoll erscheint, bei Behandlung mit phasenselektiven Cytostatika die Zellen vorher zu synchronisieren, und das Mittel dann zu verabreichen, wenn möglichst viele Zellen in der empfindlichen Phase vorliegen. Von guten Erfolgen einer solchen Therapie beim Menschen wurde berichtet

(Ganzer u. Nitze, 1971; Klein et al., 1972; Nitze et al., 1970). Es soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine selektive Wirkung auf eine bestimmte Phase des Generationszyklus auch beim *Trenimon*, das wie das Endoxan zu den alkylierenden Substanzen gehört, nachweisbar ist.

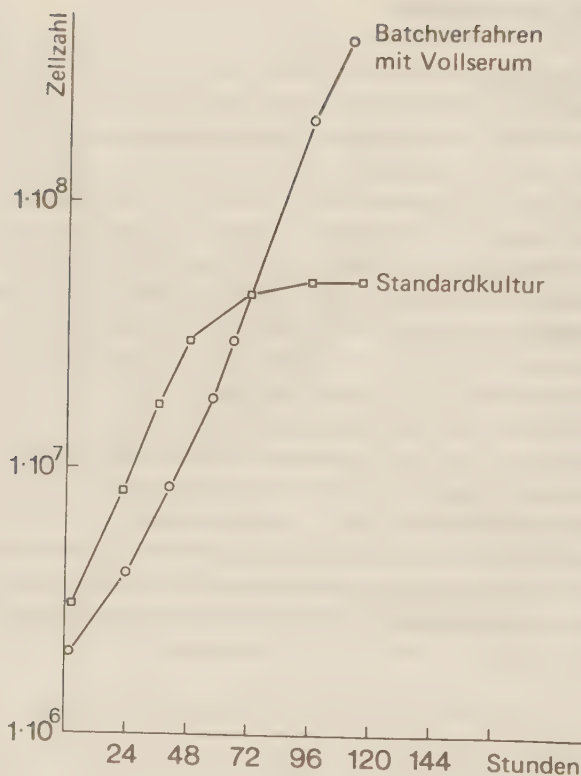
Das Trenimon gehört als Äthyleniminverbindung zu den zur Chemotherapie maligner Tumoren beim Menschen verwendeten Substanzen. Seine Wirkungsweise wird mit der Alkylierung lebenswichtiger Zellbausteine erklärt (Klammerth et al., 1971). Dies führt je nach angewandeter Dosis zur Beeinflussung der Glykolyse der Protein-, RNS- und DNS-Synthese und so zu einer Schädigung der Zellen (Palme u. Liß, 1965; Liß u. Palme, 1964). Für die unmittelbare Hemmung der DNS-Synthese sind etwa 20-100fach höhere Trenimonkonzentrationen erforderlich als für die Hemmung der Zellvermehrung nach Weitertransplantation (Dewys et al., 1969). Sehr empfindlich wird die Mitoserate der Tumorzellen beeinflusst, der Rückgang der Zellteilungen ist daher ein äußerst empfindlicher Parameter für die Zellschädigung (Pütter 1966, Liß 1970), sagt aber nichts über das biochemische Substrat des Trenimons aus.

Um die Wirkung des Trenimons auf die einzelnen Phasen des Generationszyklus von Tumorzellen zu untersuchen, wurden Yoshida-Sarkomzellen in der Kultur mit verschiedenen Methoden synchronisiert und den in der G_1 -, S- oder G_2 -Phase vorliegenden Zellen Trenimon zugegeben. Zur Beurteilung des Trenimon-effektes wurden die in den einzelnen Phasen so behandelten Zellpopulationen mit einer asynchron wachsenden Population verglichen. Als Parameter für die Trenimonwirkung wurde das Wachstum in der Kultur und nach Reimplantation sowie der Mitoseindex herangezogen.

Material und Methoden

1. Zellzüchtung:

Als Zellstamm wurden Yoshida-Sarkomzellen verwendet, die als Ascites-Zellen in jungen Mäusen des CF₁-Inzuchtstammes wachsen. In vitro wurden die Zellen als Suspension in Kulturgefäßen bei 37° C. gezüchtet (Averdunk u. Voss, 1967). Es wurde mit einer Geschwindigkeit von 40 UPM gerührt und mit einem Gasgemisch, das 5% CO₂, 20% O₂ und 75% N₂ enthielt, überlülftet. Es bestand die Möglichkeit, kontinuierlich oder in gewünschten Zeitintervallen Medium zuzugeben oder Zellsuspension zu entnehmen. Als Medium wurde Eagle-Spinner (Difco) verwendet, dies etwa 3 ml/100 ml 7,5%iges Bicarbonat und 15% fötales Kälberserum zugesetzt. Die Zellkonzentration lag zu Kulturbeginn zwischen $2-5 \times 10^5$ /ml. Die Zählung erfolgte im Coulter Counter, Modell A. Die Yoshida-Zellen wachsen unter diesen Bedingungen innerhalb der ersten 48 Stunden logarithmisch. Auf das logarithmische Wachstum folgt eine Zeitspanne geringfügigen Wachstums (Abb. 2, Standardkultur). Schließlich geht die Zellzahl zurück.



Für die Standardkultur beziehen sich die Zellzahlen jeweils auf 10 ml Suspension. Beim Batch-Verfahren wurde mit einem Volumen von 10 ml begonnen, das bei der Mediumerneuerung in Abständen von 2 Tagen proportional zur Zunahme der Zellzahl vergrößert wurde. Angegeben ist die Zellzahl im gesamten Kulturvolumen.

Die Färbung der Zellen erfolgte nach Feulgen, dazu wurde gleich nach der Entnahme in Eisessig - Äthanol 1 : 3 fixiert. Zur Bestimmung des Mitoseindex wurde die Zahl der Meta-, Ana- und Telophasen bestimmt. Dazu wurden jeweils 1000-2000 Zellen unter willkürlicher Auswahl des Zählgebietes ausgezählt.

Wenn Zellentnahmen über längere Zeit erforderlich waren, wurden durch einen Pulsgeber 3 Pumpen (Infusionspumpen Braun/Melsungen) eingeschaltet, die

1. Zellsuspension aus der Kultur absaugten,

2. Äthanol und

3. Eisessig in Auffanggefäße (Reagenzgläser in einem Fraktionssammler, dessen Vorschub mit einem Pulsgeber abgestimmt war) gaben.

2. Bestimmung des Zellwachstums in vivo:

Zur Beurteilung des Wachstums der Yoshida-Zellen in vivo wurden $0,8 - 1 \times 10^7$ Zellen in 0,3 ml Medium pro Maus i.p. injiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen nach Töten des Tieres mit 5 ml Medium, das 100 I.E./ml Heparin enthielt, ausgewaschen und die Zellzahl bestimmt.

3. Bestimmung des H^3 -Index:

Zur autoradiographischen Bestimmung des H^3 -Thymidin-Einbaus erhielten die Mäuse $1\mu\text{Ci } H^3$ -Thymidin pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal. Die Zellen wurden nach einer Stunde entnommen. In der Kultur wurden die Zellen mit $0,5\mu\text{Ci/ml } H^3$ -Thymidin 1 Stunde lang markiert.

Die Ausstriche wurden vor Herstellung des Autoradiogrammes nach Feulgen gefärbt und nach dem Trocknen nach der sogenannten

"dipping"-Methode mit Nuc 715 (Agfa Gevaert) bezogen. Die Expositionszeit betrug 4-10 Tage. Der H^3 -Thymidinindex wurde durch Auszählung von 1000-2000 Zellen bestimmt. Als markiert galten Kerne mit mindestens 5 Silberkörnern über der Hintergrundschwärzung gleich großer Flächen der Umgebung. Zur Bestimmung des H^3 -Mitoseindex, d. h. des Anteils markierter Mitosen in Prozent an der Gesamtzahl der Mitosen, wurden 100 Mitosen ausgezählt.

4. Synchronisationsverfahren

a) Chemische Synchronisation mit Fluordesoxyuridin (FUDR) oder Thymidin (TdR):

30 Minuten nach Beginn der Inkubation der Zellen in der Suspensionskultur wurde FUDR bzw. Thymidin zugegeben. Zur Bestimmung des Mitoseindex wurden in stündlichem Abstand 5 ml Zellsuspension entnommen. Um die FUDR-Wirkung aufzuheben, wurde den Zellen Thymidin zugesetzt. Die TdR-Wirkung wurde durch dreimaliges Waschen in Eagle-Medium oder durch intraperitoneale Injektion der Zellen in die Maus und Entnahme nach einer Stunde unterbrochen.

b) Physikalische Synchronisation durch Gradientenzentrifugation:

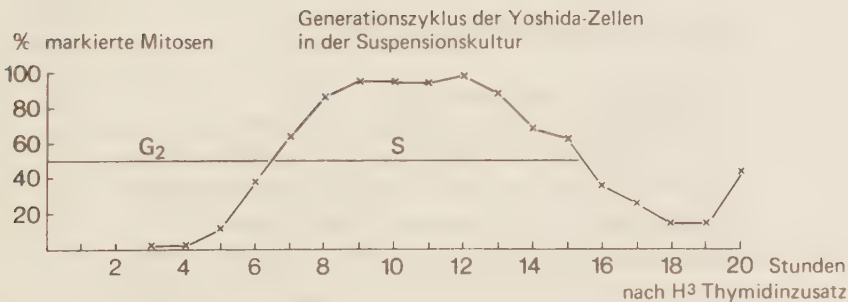
Durch Zentrifugation durch einen Dichtegradienten können Zellen entsprechend ihrer Phase-nzugehörigkeit im Generationszyklus aufgetrennt werden. Es wurde ein kontinuierlicher Ficollgradient aus einer 5%igen und einer 10%igen Ficoll in Eagle-Medium-Lösung hergestellt. Die Auftrennung der Zellen erfolgte durch 5 Minuten langes Zentrifugieren mit $80 \times g$ bei $4^{\circ} C$. Die Zellen verteilten sich auf eine gesamte Länge von 8-10 cm. Tab. 6 zeigt das Ergebnis eines Versuches.

E r g e b n i s s e :

Generationszyklus der Zellen:

Die Verdoppelungszeit der Zellen in der Kultur beträgt 18-20 Std. (Abb. 2). War die Verdoppelungszeit wesentlich länger als 20 Std., wurde die Kultur verworfen. Im folgenden (Abb. 3) wurde die Länge der einzelnen Phasen des Generationszyklus bestimmt.

Abb. 3



Dazu werden in der Kultur wachsende Yoshida-Zellen eine Std. lang mit $0,5 \mu\text{Ci/ml } H^3$ Thymidin versetzt. Nach einer Std. werden die Zellen viermal mit Eagle-Medium gewaschen ($800 \times g$, 15 Min. bei 4°C) und dann reinkubiert.

Es finden sich 42-51% markierte Zellen im Ausstrich.
6-7 Std. nach Reinkubation sind 50% der Mitosen markiert,
nach weiteren 2 Std. finden sich 90-96% markierte Mitosen.
14-16 Std. nach der H^3 -Thymidin-Gabe fällt der Anteil
markierter Mitosen wieder unter 50% ab.

Es ergeben sich aus diesen Werten folgende Zeiten:

S-Phase: 8-10 Std.,

G₂-Phase: 6-7 Std.

Aus dem Mitoseindex von 3-4% und der Verdoppelungszeit
von 18-20 Std. ergibt sich für die Länge der M-Phase ein
Wert von 30-40 Minuten.

Die Länge der G₁-Phase errechnet sich aus der Differenz von
Verdoppelungszeit und der Summe der anderen Phasenlängen und
beträgt 1-3 Stunden.

Versuche zur Synchronisation der Zellen:

1. Synchronisation mit Thymidin:

Der Synchronisationseffekt des Thymidin beruht auf der
Hemmung der DNS-Synthese. Ein Überschuß von Thymidin hemmt
die Bildung von dTTP aus dTMP, von dUDP aus UDP und die
Bildung von dCDP aus CDP (Rajewski et al., 1971).

Zunächst wurde die TdR-Konzentration ermittelt, die zu
einer Wachstumshemmung führt, die reversibel ist. Aus Tab. 1
geht hervor, daß durch eine TdR-Konzentration von 0,1 mM/l
die Zellvermehrung gehemmt wurde, nach Auswaschen des TdR
jedoch weiter geht. Unterschreitet die TdR-Konzentration
0,0125 mM/l, so ist nur eine geringe, bei 0,0075 mM/l keine
Wachstumshemmung zu beobachten. Liegt die TdR-Konzentration
erheblich über 0,1 mM/l, so wachsen die Zellen nach Ent-
fernung des TdR nur noch wenig weiter. Die weiteren Ver-
suche zur Synchronisation mit TdR-Überschuß wurden daher
mit einer Konzentration von 0,1 mM/l durchgeführt.

Tabelle 1

Hemmung des Zellwachstums durch Thymidin

Thymidinkonzentration mM/l	Vermehrungsrate 20 Std. nach Thymidingabe	Vermehrungsrate 20 Std. nach Aufhebung des Thymidinblocks
0,75	0,819 ± 0,2	0,94 ± 0,3
0,5	0,94 ± 0,26	1,32 ± 0,34
0,25	0,93 ± 0,41	1,39 ± 0,33
0,1	1,03 ± 0,13	1,73 ± 0,2
0,075	1,05 ± 0,17	1,69 ± 0,21
0,05	1,06 ± 0,14	1,54 ± 0,23
0,025	1,06 ± 0,12	1,76 ± 0,40
0,0125	1,14 ± 0,16	1,60 ± 0,46
0,003	1,50 ± 0,23	1,68 ± 0,46
0,0007	1,99 ± 0,29	1,88 ± 0,6
0	1,95 ± 0,40	1,96 ± 0,4

Legende:

Yoshida-Zellen ($4,6 \times 10^5$ Zellen/ml) wurden in der Kultur mit verschiedenen Thymidinkonzentrationen inkubiert. Nach 20 Std. wurde die Zellzahl bestimmt. Danach wurden die Zellen mit 200xg 20min bei 4°C abzentrifugiert, zweimal mit Eagle-Medium gewaschen und reinkubiert. Nach weiteren 20 Std. wurde die Zellzahl erneut bestimmt und die Vermehrungsrate berechnet. Die Kontrollkultur wuchs innerhalb der ersten 20 Std. von $4,6 \times 10^5$ Zellen/ml auf $8,97 \pm 0,18 \times 10^5$ Zellen/ml. Dies entspricht einer Vermehrungsrate von $1,95 \pm 0,4$. Den Werten der Tabelle liegen drei Versuchsserien mit Doppelansätzen zugrunde.

Es zeigte sich, daß die Zellen nach Aufhebung des Blocks über mehrere Generationszeiten normal weiterwachsen, wenn genügend frisches Medium zugeführt wird (Abb. 2, Batchkultur).

Zur Ermittlung des für die Aufhebung des TdR-Blocks günstigsten Zeitpunkts ergibt sich aus der Zyklusanalyse, daß der TdR-Überschuß für etwa 10 Stunden bestehen muß, die Länge der G_1 -, G_2 - und M-Phase. Aus Tab. 2 geht hervor, daß es günstig ist, die TdR-Blockade möglichst frühzeitig aufzuheben. Wirkt das TdR länger als 18 Stunden auf die Zellen ein, so vermehren sie sich schlechter weiter. Für die weiteren Synchronisationsversuche wurde deshalb die TdR-Blockade auf 10 Stunden eingehalten.

Zur Beurteilung des Synchronisationsgrades wird der Mitoseindex und der H^3 -Thymidinindex herangezogen. Die Ergebnisse der Mitosenbestimmung gehen aus Abb. 4 hervor.

Abb 4

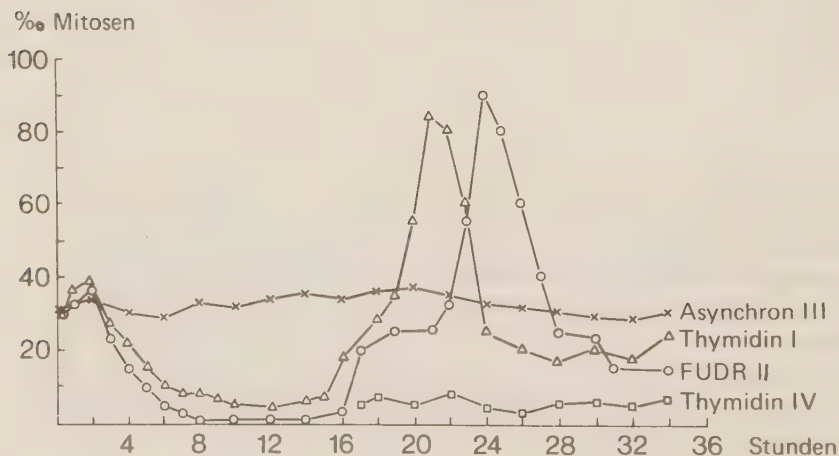


Tabelle 2

Bestimmung des optimalen Zeitpunkts für die Aufhebung des Thymidinblocks

Aufhebung des Thymidinblocks nach Stunden	Vermehrung nach 20 Stunden
--	----------------------------

8	1,83 $\pm$ 0,31
10	1,79 $\pm$ 0,42
12	1,76 $\pm$ 0,34
14	1,52 $\pm$ 0,29
16	1,46 $\pm$ 0,30
18	1,49 $\pm$ 0,24
20	1,44 $\pm$ 0,20
24	1,20 $\pm$ 0,23

Legende:

Yoshida-Zellen (4×10^5 Zellen/ml) wurden mit 0,1 mM TdR versetzt nach unterschiedlichen Zeiten mit $200 \times 10\text{min}$ bei 4°C abzentrifugiert, zweimal mit Eagle-Medium gewaschen, reinkubiert und die Zellzahl 20 Std. später bestimmt.

In der Kultur wachsende Yoshida-Zellen wurden zu Kulturbeginn mit I. Thymidin (0,1 mM) oder II. Fluorodesoxyuridin (10^{-8} M) versetzt. Nach 10 Std. wurde der Block aufgehoben. Als Kontrolle diente eine Kultur ohne Zusätze (III) und eine Kultur, bei der das Thymidin nicht entfernt wurde (IV). Die Zeichnung enthält Mittelwerte aus 3 Kulturen.

Bei den unbehandelten Zellen liegt der Mitoseindex zwischen 3-5%. Versetzt man eine Kultur mit TdR (0,1 mM/l), so nimmt die Zahl der Mitosen innerhalb von 8 Stunden kontinuierlich ab. Vereinzelt werden aber noch sich teilende Zellen gefunden. Entfernt man den TdR-Überschuß, so treten 6 Stunden später wieder soviele Mitosen wie in der Kontrollkultur auf. Nach weiteren 5 Stunden wird ein Maximum von 8% Mitosezellen erreicht. Weitere 2 Stunden später sind wieder Werte der Kontrollkultur zu beobachten. Das Verhalten des Thymidinindex geht aus der Tab. 3 hervor. Nach Aufhebung des TdR-Blocks beträgt er 80%, fällt nach 6 Stunden ab auf 26% und beträgt nach 9 Stunden nur noch 10%. Es hat sich bei den Versuchen gezeigt, daß es zum Entfernen des TdR-Überschusses einfacher und für die Zellen schonender ist, wenn diese durch einmalige Zentrifugation (800 x g, 15 Min. bei 4° C.) vom Medium getrennt und dann in einer Menge von 1×10^8 Zellen einer Maus intraperitoneal injiziert wurden. Nach einer Stunde wurden die Zellen dann wieder entnommen und in die Kultur eingesetzt. Die Zellen zeigten einen Mitosepeak, der um 1,5-2,5% höher lag als bei den Kulturen, bei denen wie in der Abb. 4 das Thymidin durch viermaliges Waschen in Eagle-Medium entfernt wurde.

2. Synchronisation mit FUDR:

Bei der Synchronisation mit FUDR (5-Fluoro-2 desoxyuridin) wird durch die Hemmung der Thymidinkinase die Bildung von dTMP (Desoxythymidin-5phosphat) aus dUMP (Desoxyuridin-5phosphat) verhindert und damit die DNS-Synthese blockiert (Rajewsky

Tabelle 3

Der H^3 -Index synchronisierter Zellen

Zeit nach Aufheben des Blocks/in Std.	% mark. Zellen	% mark. Zellen
	TdR-Synchronisation	FUDR-Synchronisation
1	81	73
2	80	74
3	78	72
4	54	65
5	48	56
6	26	41
7	18	36
8	12	14
9	10	9

Legende:

Yoshida-Zellen ($4,5 \times 10^5$ Zellen/ml) wurden 10 Std. mit 0,1 mM TdR oder mit 1×10^{-8} M FUDR versetzt. Zur Aufhebung des Blocks wurden die Zellen abzentrifugiert, einer Maus 1×10^8 Zellen injiziert und nach 1 Std. wieder entnommen. Mit der Reinkubation wurde beiden Kulturen (TdR und FUDR) je 0,5 uCi H^3 -TdR/ml zugegeben. Nach 1 Std. Inkubation mit H^3 -TdR wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen. Dies entspricht dem Wert 1 Std. nach Aufhebung des Blocks. Für den Wert 2 Std. nach Aufhebung des Blocks wurden die Zellen nach der Entnahme aus der Maus erst 1 Std. lang inkubiert und dann H^3 -TdR zugegeben und nach einer weiteren Std. ebenfalls zweimal gewaschen. Den Zahlen der Tabelle liegen die Mittelwerte von je 3 verschiedenen Kulturen zugrunde.

et al., 1971). Es ist eine Konzentration erwünscht, die nur die DNS-Synthese hemmt und andere Vorgänge unbeeinflusst läßt. Zunächst wird die niedrigste FUDR-Konzentration ermittelt, die noch zu einer Wachstumshemmung führt (Tab. 4). Diese Konzentration liegt bei ca. 5×10^{-8} M/l. Von der 7. bis 24. Stunde nach der FUDR-Zugabe ist keine Zellvermehrung nachweisbar. In diesem Konzentrationsbereich ist also eine ausreichende Hemmung erreicht. In den weiteren Versuchen wird daher die FUDR-Konzentration von 1×10^{-8} M/l verwendet. Wird jedoch Thymidin zugegeben, kann die Zelle Desoxythymidinmonophosphat direkt aus dem Thymidin bilden und die Blockade der DNS-Synthese durch FUDR umgehen (Rajewsky, 1971).

Als nächstes wird die TdR-Konzentration ermittelt, die zu einer vollständigen Aufhebung der FUDR-Blockade führt (Tab. 5). Bei einer TdR-Konzentration zwischen 0,5 und 2 mg/l wird die Hemmung aufgehoben. In den weiteren Versuchen wird eine TdR-Konzentration von 1mg/l verwendet.

Der Einfluß von FUDR auf den Mitoseindex geht aus der Abb. 4 hervor. Es ist ein schnelles Absinken der Mitosezahlen zu finden. 6-7 Stunden nach der FUDR-Zugabe treten keine Mitosen mehr auf, 7 Stunden nach Aufhebung des Blocks lassen sich wieder Mitosen nachweisen, nach 14 Stunden ist ein Maximum von 9% erreicht. Anschließend fällt die Rate wieder unter die Werte der Kontrollkultur ab.

Die Werte für den Markierungsindex der mit FUDR synchronisierten Zellen sind der Tab. 3 zu entnehmen. Nach 10stündiger Behandlung mit FUDR beträgt der Markierungsindex 75%. Nach weiteren 8 Stunden finden sich nur noch 14% markierte Zellen. Das stärkere Absinken nach 8 Stunden weist darauf hin, daß eine größere Anzahl von Zellen in die G_2 -Phase eingetreten sind.

Tabelle 4

Wirkung von verschiedenen FUDE-Konzentrationen auf das Zellwachstum

FUDE-Konzentration (M/l)	Zellvermehrung (nach 24 Std.)
10^{-6}	$1,0 \pm 0,09$
10^{-7}	$1,1 \pm 0,08$
5 x 10^{-8}	$1,3 \pm 0,11$
10^{-8}	$1,3 \pm 0,23$
5 x 10^{-9}	$1,4 \pm 0,31$
10^{-9}	$1,5 \pm 0,30$
5 x 10^{-10}	$1,6 \pm 0,30$
10^{-10}	$1,9 \pm 0,32$
0	$2,4 \pm 0,3$

Legende:

Yoshida-Zellen ($4,5 \times 10^5$ Zellen/ml) wurden mit FUDE in den angegebenen Konzentrationen versetzt. Die Zellzahl wurde nach 24 Std. bestimmt. Den Werten der Tabelle liegen 3 Versuchsansätze mit Doppelwerten zugrunde (n=6).

Tabelle 5

Bestimmung der optimalen Thymidin-Konzentration zur Aufhebung
des FUDR-Blocks

Thymidinkonzentration mg/l	Vermehrungsrate
0	1,0
0,01	1,03
0,1	1,2
0,5	1,4
1	1,52
2	1,50

Legende:

Yoshida-Zellen ($4,5 \times 10^5/\text{ml}$) wurden in 1×10^{-8} M/l FUDR 12 Std. lang inkubiert. Dann wurde Thymidin in den angegebenen Konzentrationen zugegeben und nach weiteren 10 Std. die Zellzahlen und die Vermehrungsrate bestimmt.

3. Synchronisation durch Auftrennen der Zellen auf einem Dichtegradienten:

Zellen unterscheiden sich in den einzelnen Phasen des Zellzyklus hinsichtlich ihrer Dichte (Warmsley et al., 1970 u. Schindler et al., 1971 u. 1972). Nach der Teilung besitzen die Zellen ihre geringste, in der G_2 -Phase die höchste Dichte. Aufgrund dieser Eigenschaften lassen sich die Zellen in einem Dichtegradienten auftrennen. Die Zellen verteilen sich auf eine gesamte Strecke von 8-10 cm. Um die Tumorzellen einer bestimmten Phase des Zellzyklus zuordnen zu können, werden sie in der Maus mit H^3 -Thymidin markiert und die spezifische Aktivität und der H^3 -Markierungsindex der einzelnen Schichten bestimmt (Tab. 6). In den oberen Schichten (Schicht ca. 1 cm) des Gradienten finden sich Zellen mit einer sehr geringen spezifischen Aktivität der DNS und einem niedrigen Markierungsindex. In der Mitte sind Zellen, die viel H^3 -TdR aufgenommen haben, angereichert, während in den unteren Schichten wieder Zellen liegen, die wenig H^3 -Thymidin aufgenommen haben.

Werden die Zellen nach der Auftrennung durch den Gradienten nach Schichten geordnet in verschiedene Kulturen gegeben, so zeigt sich ein Mitosepeak nach 1-2 Stunden, wenn die Zellen aus den tiefsten Schichten (Fraktion 9 und 10) stammen. Zellen aus einer mittleren Schicht (Fraktion 5) zeigen ein Mitosemaximum nach 6-8 Stunden, aus den oberen Schichten (Fraktion 1 und 2) nach 14-16 Stunden. Aus diesen Daten läßt sich ableiten, daß in den oberen Schichten Zellen der G_1 -Phase, in der Mitte Zellen der S-Phase und in den unteren solche der G_2 -Phase vorliegen. Die Fraktionen 1, 2, 5, 9 und 10 wurden zur Trennungsbehandlung verwendet. Die Zellen der Zwischenschichten wurden verworfen. Das Ausmaß der Synchronisation ist nicht so groß wie bei der chemischen Synchronisation, was sich wohl darauf zurückführen läßt, daß der Grad der Anreicherung der Zellen nicht so groß ist.

Tabelle 6

Phasenselektion durch einen Dichtegradienten

Fraktion	CP ^m /mMol DNS x 10 ⁴	markierte Zellen in Prozent
1	17,0	8
2	22,0	12
3	123,4	29
4	415,4	43
5	461,2	61
6	405,1	48
7	186,7	26
8	156,7	30
9	24,7	10
10	9,6	6

Legende:

Yoshida-Zellen wurden in der Maus durch Injektion von 1uCi H³-Thymidin/g Körpergewicht der Maus i.p. markiert. Die Zellen wurden anschließend in Eagle-Medium, das 10ug/ml Thymidin enthielt, gewaschen und auf den Ficollgradienten gegeben. Nach der Zentrifugation hatten sich die Zellen auf eine etwa 8-10 cm lange Strecke verteilt. Diese wurde in 10 gleiche Abschnitte (Fraktionen) unterteilt, die von oben nach unten numeriert wurden. Es wurde die H³-TdR-Einbaurate nach Tannhäuser und der H³-Thymidin-Markierungsindex der einzelnen Fraktionen von drei verschiedenen Gradienten bestimmt.

Versuche zur Ermittlung der Trenimonwirkung

Die empfindlichsten Parameter für die Trenimonwirkung sind die Bestimmung des Zellwachstums und der Mitosezahlen (Pütter, 1966; Liß, 1970). Zur Ermittlung der Trenimonkonzentration, die eine etwa 50%ige Hemmung des Zellwachstums nach 48 Stunden hervorruft, wurden asynchron wachsende Yoshida-Zellen in der Kultur mit verschiedenen Trenimonkonzentrationen versetzt. Aus Tab. 7 geht hervor, daß durch diese in vitro Behandlung der Zellen eine solche Hemmung durch eine Trenimonkonzentration von 0,1 $\mu\text{g/l}$ erreicht wird. Da die Wirkung des Trenimons wegen seines nachweislich starken Verbrauches von der Zelldichte abhängt (Schmidt, Diss. 1974), wurde in den Versuchen diese Trenimondosis nur bei der angegebenen Zellkonzentration von $2,4 \times 10^5$ Zellen/ml verwendet.

Die Wirkung von zwei verschiedenen Trenimonkonzentrationen auf den Mitoseindex geht aus der Abb. 5 hervor.

Abb. 5

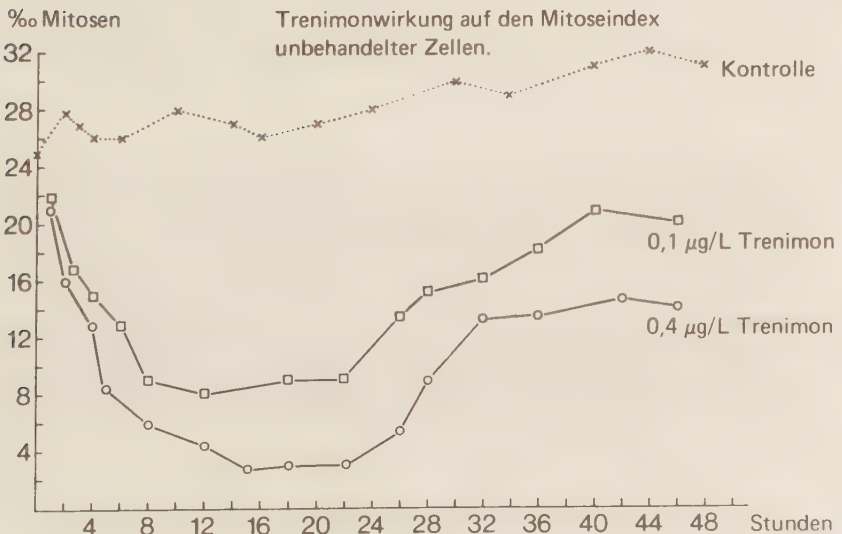


Tabelle 7

Wachstum von Yoshida-Zellen in der
Suspensionskultur unter Trenimoneinfluß

Trenimon-kon.	Wachstum nach 24 Std.	Wachstum nach 48 Std.
<u>µg/1</u>		
1,0	15,6 ± 10,3	8,4 ± 10,9 5,3* ± 3,2
0,6	35,2 ± 9,8	10,6 ± 10,3
0,2	51,4 ± 8,7	34,4 ± 9,1 42,0* ± 9,3
0,1	54,1 ± 8,7	46,2 ± 9,5 53,0* ± 8,1
0,06	63,7 ± 6,1	49,3 ± 8,5 70,0* ± 6,4
0,03	70,2 ± 5,3	64,1 ± 6,9
0,01	77,1 ± 5,9	70,2 ± 7,6 80,0* ± 6,4.

Legende:

Yoshida-Zellen ($2,4 \times 10^5$ Zellen/ml) wurden inkubiert und nach 1 Std. die angegebenen Trenimonmengen zugesetzt. Nach 24 bzw. 48 Std. wurden die Zellzahlen bestimmt. Kulturen ohne Zusätze dienten als Kontrolle. Die Angaben der Tabelle erfolgen in Prozent der Kontrolle, die sich in 24 Std. von $2,4 \times 10^5$ Zellen/ml auf $5,04 \times 10^5$ Zellen/ml und in 48 Std. auf $11,08 \times 10^5$ Zellen/ml vermehrt hatte. Dieses Wachstum wurde als 100%-Wert zugrunde gelegt. Zur Bestimmung des Wachstums in vivo wurde 2 Std. nach Inkubation der Zellen mit Trenimon ein Aliquot der Kultur (etwa 10^6 Zellen/ml) Mäusen i.p. injiziert und nach 48 Std. entnommen. Die mit * gekennzeichneten Zahlen machen Angaben über das Zellwachstum in vivo. Den Werten der Tabelle liegen 4 Versuchsserien mit Doppelwerten zugrunde.

Bei den asynchron wachsenden Yoshidazellen erfolgte gleich nach der Zugabe von Trenimon ein Abfall der Mitosezahlen. Der Mitoseindex erreicht 8-20 Stunden später ein Minimum. Anschließend nimmt die Zahl der sich teilenden Zellen wieder zu. Es werden aber nach 48 Stunden die Werte der Kontrollkultur nicht erreicht. Das Ausmaß des Mitoseabfalls ist konzentrationsabhängig. Die Kultur, die mit $0,4 \mu\text{g/l}$ Trenimon versetzt wurde, erreicht niedrigere Mitosezahlen als die Kultur, die mit $0,1 \mu\text{g/l}$ behandelt wurde. Die Zunahme der Mitosen erfolgt aber zur gleichen Zeit.

Trenimonwirkung auf die einzelnen Phasen des Zellzyklus

Im Folgenden soll nun untersucht werden, ob die Trenimondosis, die auf asynchron wachsende Zellen eine 50%ige Hemmung hervorrief, eine unterschiedliche Wirkung auf Zellen einer bestimmten Phase hat. Hierzu werden die Kulturen mit den beschriebenen Verfahren synchronisiert und in der S-, G_2 - und G_1 -Phase mit Trenimon versetzt. Als Kontrollen dienen:

1. Kulturen ohne Zusätze (Wachstum 100 %)
2. Kulturen, die mit FUdR oder TdR versetzt wurden. Durch diese Substanzen tritt, verglichen mit den asynchronen Kulturen, eine gewisse Hemmung auf
3. Kulturen mit $0,1 \mu\text{g Trenimon/l}$, bei denen eine 50%ige Hemmung zu erwarten war.

Die Versuche zur Wirkung von Trenimon auf Zellen, die durch einen Dichtegradienten in die verschiedenen Phasen aufgetrennt worden waren, fanden in einer getrennten Serie statt, s. u.

1. Wirkung von Trenimon auf die Zellen der S-Phase:

Aus den Ergebnissen der Vorversuche (Tab. 3 und Abb. 4) geht hervor, daß eine Stunde nach Aufheben der Blockade zu erwarten ist, daß sich sehr viele Zellen in der S-Phase angereichert

haben. In den Kulturen, die für die Trenimonversuche Verwendung fanden - es wurden zwei Versuchsserien unter identischen Bedingungen durchgeführt - fand sich 1 Stunde nach Aufhebung der Blockade (d. h. Entfernen des Thymidin durch intraperitoneale Injektion der Zellen in die Maus bzw. Zusatz von Thymidin zur FUDR-Kultur) bei den durch TdR synchronisierten Zellen ein Mitoseindex von 0,4% bzw. 0,2%, bei der FUDR-Kultur 0 bzw. 0,1%. Der H^3 -TdR-Markierungsindex betrug 84% bzw. 81% bei den TdR und 76% bzw. 72% bei den FUDR synchronisierten Zellen. Da definitionsgemäß nur Zellen der S-Phase Thymidin aufnehmen, müssen sich 70-84% der Zellen in der S-Phase befunden haben. Die Zellen dieser Phase wurden durch das Trenimon ebenso stark gehemmt wie die asynchron wachsende Kontrollkultur, so wurden z. B. die asynchron wachsenden mit Trenimon versetzten Zellen nach 48 Std. auf etwa 50% gehemmt, das Wachstum der in der S-Phase mit Trenimon behandelten Zellen auf etwa 40% der Kontrolle gehemmt. Es ist dabei die TdR oder FUDR bedingte Hemmung des Zellwachstums zu berücksichtigen, die allein etwa 10-20% beträgt. Die Zellen, die nach der Inkubation in vitro mit Trenimon Mäusen i.p. injiziert wurden, erfuhren etwa die gleiche Hemmung (Tab. 8).

Ein besonders empfindlicher Parameter für die Trenimonwirkung ist das Verhalten der Mitosen (Abb. 5).

Aus der Abb. 6 ist der Trenimoneinfluß auf Zellen der S-Phase an Hand der Ausbildung der Mitosen zu ersehen und kann verglichen werden mit dem Einfluß des Trenimon auf asynchron wachsende Zellen (Abb. 5). Trenimon bewirkt eine Abnahme der Mitosenzahl, es treten aber weiterhin Mitosen auf. Der synchronisationsbedingte Mitosepeak tritt mit einer zeitlichen Verzögerung von 6 Stunden auf. Im Peak finden sich etwa die Hälfte der Mitosen der synchron wachsenden Kontrollkultur.

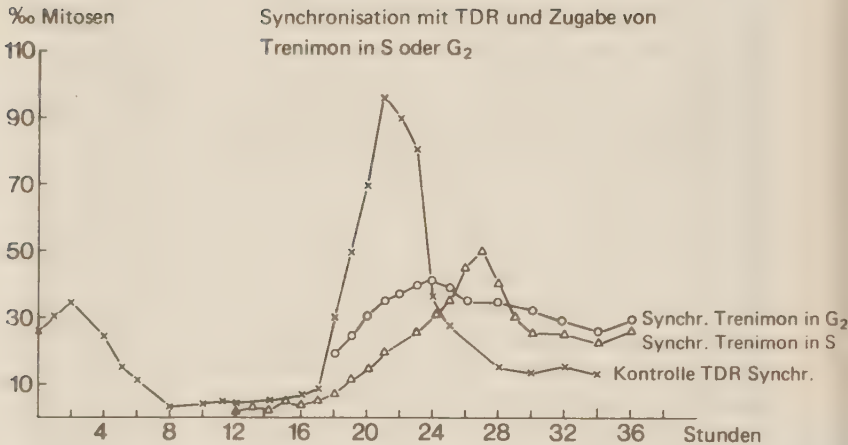
Tabelle 8

Wirkung von Trenimon auf die einzelnen Phasen des Generationszyklus von Yoshida-Zellen

mit S-Phase-Zellen angereicherte		mit G ₂ -Phase-Zellen angereicherte	
Population		Population	
24 Std.		24 Std.	
48 Std.		48 Std.	
1. Zellen + Thymidin	91,5/95,7	89,7/91,6	88,3/85,9
	94,6*/89,1*		-
2. Zellen + FUDDR	88,5/86,3	87,8/82,2	82,3/77,9
		82,4*/79,5*	-
3. Zellen + Thymidin	69,6/74,3	43,2/40,4	49,2/37,2
+ Trenimon		51,7*/53,5*	58,5*/63,3*
4. Zellen + FUDDR	61,4/60,6	39,7/40,7	33,9/37,1
+ Trenimon		43,7*/44,4*	42,9*/46,0*

Legende:

Die Yoshida-Zellen wurden mit TdR oder FUDDR synchronisiert und in den einzelnen Phasen mit 0,1 µg/1 Trenimon versetzt. Zur Bestimmung des Wachstums wurde ein Aliquot der Kultur (etwa 1 x 10⁶ Zellen) Mäusen i.p. injiziert (in vivo) oder in Kulturen weitergezüchtet. Eine Kultur ohne Zusätze diente als Kontrolle; dieser wurden zur gleichen Zeit wie den Synchronkulturen Zellen entnommen und in vitro oder in vivo weitergezüchtet. Die Angaben der Tabelle erfolgen in Prozent der Kontrolle, die in 24 Std. von 2,42 x 10⁵ Zellen/ml auf 5,32 x 10⁵/ml gewachsen ist, d. h. sich um das 2,2fache vermehrt hat. In 48 Std. hatte sich die Kultur auf 11,71 x 10⁵/ml und damit um das 4,8fache vermehrt. Dieses Wachstum wurde als 100%-Wert zugrunde gelegt. Die mit * gekennzeichneten Zahlen machen Angaben über das Zellwachstum in vivo.



Diese Zahlen zeigen, daß durch Trenimon eine Verlängerung der S-Phase oder G₂-Phase eintritt. Ähnliches wurde über eine Verlängerung der G₂-Phase bei asynchron in der Maus wachsenden Zellen von Palme und Liß beschrieben (Palme u. Liß, 1965). Zwischen den mit FUDR und den mit TdR synchronisierten Zellen bestanden auch in diesen Versuchen keine wesentlichen Unterschiede.

2. Wirkung von Trenimon auf die G₂-Phase:

Die G₂-Phase ist definiert als Zeitspanne zwischen Vollendung der DNS-Synthese (S-Phase) und Eintritt in die Mitosephase. Aus dem Verhalten des Markierungsindex (Tab. 3) und der Mitosen

(Abb. 4) der synchronisierten Zellen ist zu erwarten, daß sich die Zellen 7 Stunden nach Aufhebung der TdR- bzw. 8 Stunden nach Aufhebung der FUDR-Blockade in der G_2 -Phase befinden müßten. Bei den für die Trenimonversuche verwendeten Kulturen betrug der Mitoseindex zu diesem Zeitpunkt 0,9 bzw. 1,4 % bei der TdR-Kultur und der Markierungsindex 14 bzw. 12%. Bei der FUDR-Kultur fand sich ein Mitoseindex von 2,1 bzw. 2,6 und ein Markierungsindex von 10 bzw. 12%. Somit befanden sich 70-80% der Zellen in der G_2 -Phase.

Das Trenimon wurde also 7 Stunden bei der TdR- und 8 Stunden bei der FUDR-Synchronisation nach Aufhebung der DNS-Blockade zugegeben.

Zwischen der Hemmung der asynchron wachsenden und den G_2 -Phase-Zellen besteht kein wesentlicher Unterschied, wenn man die durch TdR bzw. FUDR bedingte Hemmung berücksichtigt. Es besteht auch kein signifikanter Unterschied zwischen der Trenimonwirkung auf Zellen der S-Phase verglichen mit der auf Zellen der G_2 -Phase; so wird das Wachstum der mit TdR synchronisierten und in der S-Phase mit Trenimon behandelten Zellen nach 48 Std. auf etwa 40% gehemmt, während das Wachstum der ebenfalls mit TdR synchronisierten, jedoch in der G_2 -Phase mit Trenimon behandelten Zellen auf etwa 43% gehemmt wird. Auch hier sind die Ergebnisse nach TdR-Synchronisation annähernd gleich denen nach FUDR-Synchronisation, ebenso die in vivo erzielten Ergebnisse. Der Mitoseindex nimmt nach der Trenimongabe in der G_2 -Phase schnell ab. Es treten weiterhin Mitosen auf. Ein ausgeprägter Mitosepeak ist nicht vorhanden (Abb. 6).

3. Wirkung von Trenimon auf Zellen der G_1 -Phase:

Das Trenimon wurde den mit TdR synchronisierten Zellen 16 Stunden und den mit FUDR synchronisierten Kulturen 20 Stunden

nach Aufhebung der Blockade zugesetzt. Es fand sich in den Kulturen ein Mitoseindex von ca. 2% und ein Markierungsindex von ca. 20%. Es ist daher anzunehmen, daß zu diesem Zeitpunkt eine Anreicherung der Zellen in der G_1 -Phase stattgefunden hat. Der Grad der Anreicherung müßte bei 50% liegen. Durch Trenimon tritt in vivo und in vitro gleiche Hemmung auf wie bei den in anderen Phasen behandelten Zellen.

4. Wirkung von Trenimon auf Zellen der G_1 /S-Grenze:

Das Trenimon wurde 1 Stunde vor Beendigung der TdR- bzw. der FUdR-Blockade zugegeben. Es bewirkte gleiche Hemmungen wie bei den anderen Kulturen.

Einfluß von Trenimon auf Zellen, die durch einen Dichtegradienten in verschiedene Phasen aufgetrennt wurden:

Nach dem Auftrennen auf dem Dichtegradienten (s. o.) wurden 3 Schichten verwendet, die bestimmten Phasen zuzuordnen waren. Die obere Schicht, Fraktion 1 u. 2, hatte einen H^3 -Markierungsindex von 12,1% bzw. 15,2%. In der Kultur trat ein Mitosepeak nach 15 Std. auf (Zellen der G_1 -Phase). Die mittlere Schicht, Fraktion 5, hatte einen H^3 -Markierungsindex von 72,5% bzw. 70,7%. Der Mitosepeak trat nach 12 Stunden auf (Zellen der S-Phase). Die untere Schicht, Fraktion 9 u. 10, zeigte einen H^3 -Markierungsindex von 14% bzw. 19%. Der Mitosepeak trat etwa 1-3 Std. nach der Inkubation auf (Zellen der G_2 -Phase). Zur Beurteilung der Trenimonwirkung dienten als Kontrolle:

1. Zellen, die nach Auftrennung auf dem Gradienten wieder vereint wurden und
2. Zellen, die aus den einzelnen Schichten stammten.

Aus den Ergebnissen (Tab. 9) ist zu ersehen, daß die Zellen aus den verschiedenen Schichten durch Trenimon (ebenfalls

Tabelle 9

Wirkung von Trenimon auf Zellen in verschiedenen Phasen
nach Auftrennung auf einem Dichtegradienten

	in vitro	in vivo
asynchron	100	100
asynchron + Trenimon	40,2/41,7	47,9/50,7
G ₁ -Phase-Zellen + Trenimon	42,6/38,4	55,4/46,3
S-Phase-Zellen + Trenimon	45,1/39,8	47,2/49,1
G ₂ -Phase-Zellen + Trenimon	41,6/39,8	49,6/50,5

Legende:

Zellen aus drei verschiedenen Fraktionen des Dichtegradienten (Fraktion 1 u. 2 = Zellen der G₁-Phase; Fraktion 5 = Zellen der S-Phase; Fraktion 9 u. 10 = Zellen der G₂-Phase) und eine asynchron wachsende Kultur wurden mit 0,1 µg/l Trenimon versetzt und in vitro weitergezüchtet bzw. ein Aliquot der Kultur (etwa 1×10^7 Zellen) Mäusen i.p. injiziert (in vivo). 48 Std. nach Trenimonzugabe wurden die Zellzahlen bestimmt. Die Angaben der Tabelle erfolgen in Prozent der unbehandelten Kontrolle, die sich in 48 Std. von $2,4 \times 10^5$ Zellen/ml auf $11,28 \times 10^5$ Zellen/ml vermehrt hatte.

0,1 µg/ml) gleich stark gehemmt wurden. Es zeigte sich auch kein Unterschied zu den gemischten Zellen. Vergleiche mit der Tab. 8 lassen erkennen, daß auch keine wesentlichen Unterschiede zur chemischen Synchronisation auftreten.

DISKUSSION

I. Synchronisationsverfahren:

In einer normalen Zellpopulation liegen Zellen aller Phasen des Generationszyklus nebeneinander vor, sie wachsen asynchron. Die Versuche zur Synchronisation in dieser Arbeit werden durchgeführt, weil es sich gezeigt hat, daß Tumorzellen in bestimmten Phasen des Generationszyklus besonders empfindlich gegen die Einwirkung von Cytostatika sind (Bhuyan et al., 1972, 1973, Bruce et al., 1966, Klein et al., 1971, Mauro u. Madoc-Jones, 1970, van Pütten et al., 1972, Lampkin et al., 1969). Will man Zellen in einer empfindlichen Phase beeinflussen, muß man mit geeigneten Methoden möglichst viele Zellen in dieser Phase anreichern. Von der Fragestellung hängt die Auswahl der Methode ab. Sollen in vivo wachsende Zellen synchronisiert werden, finden chemische Verfahren wie die Synchronisation mit Vinblastin, Cytosinarabinosid oder Hydroxyharnstoff Anwendung (Klein et al., 1971, Lampkin et al., 1969, Rajewsky et al., 1971). In der Kultur können sowohl physikalische Methoden wie die Selektionstechnik oder die Auftrennung auf dem Dichtegradienten (Schindler u. Hürni, 1971, Schindler et al., 1972, Pfeiffer u. Tolmach, 1967, Tobey, 1972, Warmsley u. Pasternak, 1970, Warmsley et al., 1970), als auch chemische Verfahren wie die Synchronisation mit FUDR oder TdR angewandt werden (Eidinoff u. Rich, 1959, Lambert u. Studzinski, 1969, Galavazi u. Bootsma, 1966, Galavazi et al., 1966). Während durch physikalische Methoden eine Beeinflussung des Stoffwechsels nicht zu erwarten ist, haben chemische Synchronisationsverfahren, die über eine Hemmung der DNS-Synthese wirken, z. B. FUDR, TdR, auch Nebenwirkungen auf andere Vorgänge

(Rajewsky et al., 1971). So beeinflusst ein TdR-Überschuß auch die DNS-Synthese und hemmt die Dihydroorotase und die Aspartattranscarbamylase (Bresnick u. Blatchford, 1964). Nach Aufhebung des TdR-Blocks bleibt die alkalische Desoxyribonuclease erhöht (Lambert u. Studzinski, 1969).

Yoshida-Zellen sind gegen die Einwirkung von TdR empfindlicher als andere tierische Zellen. Zur Hemmung der DNS-Synthese reicht eine Konzentration von 0,1 mM, während bei anderen Zellen wesentlich höhere Konzentrationen erforderlich waren (Galavazi u. Bootsma, 1966, Galavazi et al., 1966). Die Konzentration für die FUDR-Synchronisation entspricht den Angaben der Literatur bezüglich anderer Zellen (Eidinoff u. Reich, 1959).

Für die Synchronisation ist es notwendig, die Länge der einzelnen Phasen des Generationszyklus der in der Kultur wachsenden Yoshida-Zellen zu kennen. Experimentell ergibt sich aus dem zeitlichen Verlauf des Auftretens markierter Mitosen (Abb. 3) eine Länge der S-Phase von 8-10 Std. Diese Zeit stimmt überein mit der Zeit, die sich rechnerisch aus der Verdoppelungszeit T_c (18-20 Stunden) und dem Prozentsatz markierter Zellen N_s / N_t eine Stunde nach Gabe von H^3 -Thymidin (48-51%) ergibt. Hieraus errechnet sich nach Baserga (Baserga u. Wiebel, 1965) eine Länge der S-Phase von etwa 10 Stunden, wobei die Autoren von der vereinfachenden Annahme ausgehen, daß alle Zellen einer Kultur den Generationszyklus gleich schnell durchlaufen und die Zellzahl während der Beobachtungszeit konstant bleibt, d. h. gleich viele Zellen absterben wie neu gebildet werden (Lennartz, 1964). Zu dem vorliegenden Kultursystem ist aber zu erwarten, daß Zellen mit unterschiedlichen Generationszeiten vorliegen. Die Zellzahl nahm innerhalb von 12 Std. um etwa 50% zu. Das Modell von Baserga kann deshalb nur grob annähernde Werte für die Länge der einzelnen Phasen erbringen.

Aus der Analyse des Zellzyklus verschiedener Kulturen ergab sich, daß es wichtig ist, die Kulturmethode zu standardisieren. So wurden die Yoshida-Zellen 5 Tage nach der Transplantation der Maus entnommen und in einer Zellkonzentration von ca. 4×10^5 Zellen/ml in die Kultur eingesetzt. Die Zugabe von FUDR oder TdR erfolgte 1 Std. nach Kulturbeginn. Ausgewertet wurde nur, wenn die Generationszeit der Kontrollkultur zwischen 18-22 Std. lag.

Nach TdR-Zugabe nimmt die Zahl der Mitosen langsam ab, Zellen, die zum Zeitpunkt der Thymidingabe in der G_2 -Phase waren, teilen sich noch. Etwa 5-6 Stunden nach Aufhebung des TdR-Blocks treten Mitosen auf, weil die Zellen, die in der S-Phase arretiert waren, die G_2 -Phase in dieser Zeit durchlaufen haben. Nach weiteren 6 Std. ist ein Mitosepeak zu finden durch Zellen, die nach dem TdR-Zusatz die G_2 -, M- und G_1 -Phase durchlaufen haben und an der Grenze zwischen G_1 - und S-Phase stehengeblieben sind.

Zwischen dem Aufheben des TdR-Blocks und dem Mitosepeak vergehen nur 11 Std. (Abb. 4), während aus der autoradiographischen Zyklusanalyse die Summe von S- + G_2 -Phase mindestens 15 Std. betragen müßte.

Die Verschiebung des Mitosepeaks um 4 Std. scheint mit einer Verkürzung der S-Phase einherzugehen. Auch Bostock (Bostock, 1971) beschrieb, daß unter TdR-Überschuß die DNS-Synthese in geringer Rate weitergeht. Durch FUDR werden die Zellen ebenfalls in der S-Phase arretiert. Die Mitoserate fällt schneller und vollständiger ab als bei der TdR-Kultur (Abb. 4.). 7 Std. nach Thymidinzugabe haben die Zellen die G_2 -Phase durchlaufen und teilen sich. Nach 15 Std. tritt ein Mitosepeak auf, verursacht durch Zellen, die an der G_1 -/S-Grenze arretiert waren.

Beim Vergleich der beiden chemischen Synchronisationsverfahren zeigt es sich, daß durch FUDR mehr Zellen in der S-Phase arretiert werden, der Mitosepeak durch TdR aber ausgeprägter ist.

Die physikalische Methode hat den Vorteil, daß die Zellen nicht oder alle gleichmäßig vorgeschädigt werden, sie hat jedoch den Nachteil, daß der Grad der Anreicherung nicht so groß ist wie bei der chemischen Synchronisation.

II. Wirkung von Trenimon auf Zellen in bestimmten Phasen des Zellzyklus:

Es wurde untersucht, ob Yoshida-Ascites-Tumorzellen in einer bestimmten Phase des Generationszyklus besonders empfindlich sind gegenüber dem alkylierend wirkenden Cytostatikum Trenimon. Als Parameter dienten die In-vitro- und In-vivo-Vermehrung der Zellen und der Mitoseindex. Gegen eine ausgesprochen selektive Wirkung des Mittels auf eine bestimmte Phase sprechen die Ergebnisse der Dosis-Wirkungs-Beziehung auf die Zellvermehrung. Beim Vergleich der Hemmung des Zellwachstums in Beziehung zur gewählten Trenimondosis (Tab. 7) ist eine Sättigungskurve oder Kurve mit einer Schulter, wie sie für Substanzen gefordert wird, die phasenselektiv wirken (Dewys u. Kight, 1969) nicht erkennbar. Auch das Verhalten der Mitoseraten unter Trenimoneinfluß spricht nicht für eine selektive Wirkung des Mittels (Abb. 5).

Würden die Zellen in der G_2 -Phase nicht durch Trenimon beeinflusst, müßten die Mitosezahlen innerhalb der ersten 5 Stunden konstant bleiben.

Würden die Zellen der G_2 -Phase selektiv gehemmt, müßte die Mitoserate bald nach Trenimonzusatz auf den Minimalwert absinken und nach spätestens 6 Std. wieder ansteigen.

Würden die Zellen der G_2 -Phase ähnlich wie die Zellen der S-Phase zu 50% gehemmt - entsprechend der gewählten Trenimondosis - so müßte die Zahl der Mitosen gleich nach der Trenimonzugabe auf Werte absinken, wie sie anzutreffen sind, wenn das Trenimon Zellen der S-Phase trifft.

Durch Trenimon nimmt die Mitoserate asynchron wachsender Zellen jedoch kontinuierlich ab (Abb. 5). Das Verhalten der Mitosen ist hinsichtlich einer selektiven Wirkung des Trenimons schwer zu interpretieren. Es war daher notwendig, die Wirkung des Mittels an synchronisierten Zellen zu untersuchen.

Vergleicht man die Hemmung der Zellen in zwei verschiedenen Phasen miteinander, so lassen sich keine wesentlichen Unterschiede ablesen, d. h. die Hemmung der in der G_2 -Phase mit Trenimon behandelten Zellen ist etwa so stark wie die Hemmung der in der S-Phase so behandelten Zellen (Tab. 8). Es muß allerdings berücksichtigt werden, daß es sich nur um eine Teilsynchronisation handelt, so daß sich mögliche Unterschiede verwischen können. Eine Hemmung von z. B. 35% der S-Phase-Zellen und 70% der G_2 -Phase-Zellen - wenn zum Zeitpunkt der Trenimonbehandlung etwa 80% der Zellen in dieser Phase vorliegen - könnte unter Berücksichtigung des Verwischungseffektes durchaus auf 40 bzw. 60% schrumpfen.

Es liegen für jede einzelne Phase 12 verschiedene Versuchsergebnisse vor, weil sich die Werte, die man durch die drei verschiedenen Synchronisationsverfahren erhält, ebenso wie die In-vivo- und In-vitro-Versuche ergänzen. Bei der Analyse der Werte der Tab. 9 ist zu beachten, daß die durch FUDR oder TdR bedingte Hemmung jeweils der Trenimon bedingten Hemmung der asynchron wachsenden Kultur addiert werden muß. Somit läßt sich die stärkere Hemmung der chemisch synchronisierten Zellen im Vergleich zu den asynchronen Kontrollen erklären.

Die beschriebenen Versuche zeigen, daß Trenimon nicht signifikant selektiv auf eine der Phasen wirkt, und sprechen dagegen, daß alkylierende Substanzen eine solche Wirkung haben.

Die erzielten Ergebnisse stehen in deutlichem Widerspruch zu den von Klein (Klein et al., 1971 u. 1972) beschriebenen Untersuchungen. Von diesen Autoren wurde mit Vincristin synchronisiert, mit Endoxan behandelt und eine um 50% höhere Hemmung gefunden, wenn das Endoxan auf Zellen der S-Phase trifft. Die durch das Vincristin allein bedingte Hemmung des Wachstums der Tumorzellen wurde in den Arbeiten nicht angegeben. Obwohl sich die hier beschriebenen Ergebnisse aus methodischen Gründen nicht direkt mit denen von Klein vergleichen lassen, kann daraus abgeleitet werden, daß nicht alle alkylierenden Cytostatika phasen-selektiv wirken und daß es noch verfrüht erscheint, bei der cytostatischen Behandlung von Tumoren beim Menschen zu versuchen, die Krebszellen zu synchronisieren, um besonders gute Erfolge durch Behandlung mit alkylierenden Substanzen zu erzielen.

Zusammenfassung

Ausgehend von den Untersuchungen von Klein (Klein et al., 1971 u. 1972), der eine selektive Wirkung von Endoxan auf die S-Phase beschrieb, sollte untersucht werden, ob das alkylierende Cytostatikum Trenimon Tumorzellen, die sich in einer bestimmten Phase des Generationszyklus befinden, selektiv hemmt. Es wurden für die Experimente Yoshida-Sarkom-Zellen verwendet, die als Ascites-Tumor auf der Maus und in der Suspensionskultur gezüchtet werden können. Diese Zelllinie wurde mit Fluoro-deoxy-uridin (10^{-8} M/l) oder Thymidin (0,1 mM/l) chemisch und durch Auftrennung auf einem Ficoll-Dichtegradienten physikalisch synchronisiert. Das Ausmaß der Synchronisation wurde anhand des Mitoseindex und des H^3 -Thymidin-Markierungsindex bestimmt. Bei der chemischen Synchronisation erhielten wir Zellpopulationen, die etwa 70-80% in der S- bzw. G_2 -Phase und etwa 50% in der G_1 -Phase angereichert waren. Bei der Synchronisation durch einen Ficoll-Dichtegradienten war der Grad der Anreicherung nicht so groß wie bei der chemischen Synchronisation. Die Trenimonwirkung wurde am Wachstum der Zellen in der Kultur und in der Maus und anhand des Mitoseindex beurteilt. Es wurde eine Trenimondosis angewendet, die das Zellwachstum um 50% hemmt. Bei der Behandlung von Zellpopulationen, die in den einzelnen Phasen angereichert waren, traten keine wesentlichen Unterschiede auf. Eine signifikant phasenselektive Wirkung des Trenimons war also nicht nachweisbar.

Literaturverzeichnis

1. AVERDUNK, R. und VOSS, H.
Suspensionskulturverfahren für permanente
Zelllinien von Warmblütern
Zbl. Bakt. 207 (1968) 265-281
2. BASERGA, R. und WIEBEL, F.
The Cell Cycle of Mammalian Cells
In Methods in Cancer Research
Harris Busch ed., Academic Press
New York (1965) 45-116
3. BIUYAN, B.K., FRASER, T.J., LI, L.H.
Cell Cycle Phase Specificity and Biochemical
Effects of Ellipticine on Mammalian Cells
Cancer Research 32 (1972) 2538-2544
4. BIUYAN, B.K., SCHEIDT, L.C., FRASER, T.J.
Cell Cycle Phase Specificity of Antitumor Agents
Cancer Research 32 (1972) 398-407
5. BIUYAN, B.K., FRASER, T.J., GRAY, L.C., KUENTZEL, S.L.
and NEIL, G.L.
Cell-Kill Kinetics of Several S-Phase-
specific Drugs
Cancer Research 33 (1973) 888-894
6. DOSTOCK, C.J., PRESCOTT, D.M., KIRKPATRICK, J.B.
An Evaluation of a Double Thymidine Block
for Synchronizing Mammalian Cells
at the G_1/S Border
Experimental Cell Research 68 (1971) 163-168

7. BRESNICK, E.A. and BLATCHFORD, K.
Inhibition of Dihydroorotase by
Purines and Pyrimidines
BBA 81 (1964) 150-157
8. BRUCE, W.R., MEEKER, B.E., VALERIOTE, F.A.
Comparison of the Sensitivity of
Normal Hematopoetic and Transplanted
Lymphoma Colony - Forming Cells to
Chemotherapeutic Agents Administered in Vivo
J. Nat. Cancer Inst. 37 (1966) 233-245
9. BRUCE, W.R., MEEKER, B.E., POWERS, W.E., VALERIOTE, F.A.
Comparison of Dose- and Time- Survival
Curves for Normal Hematopoetic and
Lymphoma Colony-Forming-Cells Exposed
to Vinblastine, Vincristine, Arabinosyl-
cytosine, and Amethopterin
J. Nat. Cancer Inst. 42 (1969) 1015-1023
10. DEWYS, W.D. and KIGHT, N.
Kinetics of Cyclophosphamide Damage -
Sublethal Damage Repair and Cell-Cycle
Related Sensitivity
J. Nat. Cancer Inst. 42 (1969) 155-163
11. EIDINOFF, M.L., RICH, M.A.
Growth Inhibition of a Human Tumor Cell
Strain by 5-Fluoro-2-Deoxyuridine:
Time Parameters for Subsequent Reversal
by Thymidine
Cancer Research 19 (1959) 521-524

12. ERIKSON, R.L. and SZYBALSKI, W.
Molecular Radiobiology of Human Cell Lines
IV. Variation in Ultraviolet Light and
X-Ray Sensitivity during the Division Cycle
Radiation Research 18 (1963) 200-212
13. FARBER, J., STEIN, G., BASERGA, R.
The Regulation of RNA-Synthesis During
Mitosis
Biochem. Biophys. Res. Comm. 47 (1972) 970-797
14. GALAVAZI, G., SCHENK, H., BOOTSMA, D.
Synchronization of Mammalian Cells in Vitro
by Inhibition of DNA-Synthesis
I. Optimal Conditions
Exptl. Cell Research 41 (1966) 428-437
15. GALAVAZI, G. and BOOTSMA, D.
Synchronization of Mammalian Cells in Vitro
by Inhibition of DNA-Synthesis
II. Population Dynamics
Exptl. Cell Research 41 (1966) 438-451
16. GANZER, U. und NITZE, H.R.
Die Röntgenbestrahlung synchronisierter
Tiertumoren
Arch klin. exp. Ohr.- Nas.- und Kehlkopf-
heilkunde, Bd. 196, Heft 2 (1970)
17. GANZER, U. und NITZE, H.R.
Die Synchronisation menschlicher Gewebe in vivo
Arch klin. exp. Ohr.- Nas.- und Kehlkopf-
heilkunde, Bd 198 (1971) 239-246

18. HOWARD, A. and PELC, S.R.
Synthesis of DNA in Normal and Irradiated
Cells and Its Relation to Chromosome Breakage
Heredity 6 (1953) 261-273
19. KLAMMERTH, Q.L. and KOPUN, M.
The Influence of Trenimon upon
Deoxyribonucleic Acid in vitro
Eur. J. Biochem. 21 (1971) 199-203
20. KLEIN, H.O., GROSS, R., LENNARTZ, K.J.
Untersuchungen zur Proliferationskinetik
und Synchronisation menschlicher Tumorzellen
und ihre Bedeutung für die cytostatische Therapie
Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für
Innere Medizin, 77 Bd. by J.F. Bergmann (1971)
21. KLEIN, H.O., LENNARTZ, K.J., HABICHT, W., EDER, M., GROSS, R.
Synchronisation von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen
bei der Anwendung eines alkylierenden Cytostatikums
Klinische Wochenschrift 48 (1970) 1001-1005
22. KLEIN, H.O. und LENNARTZ, K.J.
In-vitro-Untersuchungen zur Proliferationskinetik
von Erythroblastosen, myeloischen Vorstufen und
Tumorzellen des Menschen
Med. Welt 21 (1970) 1853-1855
23. KLEIN, H.O., LENNARTZ, K.J., GROSS, R., EDER, M., FISCHER, R.
In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen zur
Zellkinetik und Synchronisation menschlicher
Tumorzellen
DMW 35 (1972) 1275-1282

24. LAMBERT, W.C. and STUDZINSKI, G.P.
Thymidine as a Synchronizing Agent
II. Partial Recovery of HeLa Cells from
Unbalanced Growth
J. Cell Physiol. 73 (1969) 261-269
25. LAMPKIN, B.C., NAGAO, T., MAUER, A.M.
Synchronization of the Mitotic Cycle in
Acute Leukaemia
Nature Vol. 222 (1969) 1274-1275
26. LENNARTZ, K.J.
Proliferationskinetik von Tumorzellen
In Fortschritte der Krebsforschung
Schattauer Verlag, Stuttgart 1969, 335
27. LISS, E.
Wirkungsmechanismen von Fungiziden,
Antibiotika und Cytostatika
Sonderdruck aus Internationales Symposium
Akademie Verlag, Berlin 1970
28. LISS, E. und PALME, G.
Der Einfluß von alkylierenden Zytostatika
auf den Nukleinsäurestoffwechsel von Ehrlich-
Ascites-Tumorzellen
Z. Krebsforsch. 66 (1964) 196
29. MAURO, F., MADOC-JONES, H.
Age Response of Cultured Mammalian Cells
to Cytotoxic Drugs
Cancer Research 30 (1970) 1397-1408

50. MAURO, F. and ELKIND, M.M.
Differences in Survival Variations during the
Growth Cycle of Cultured Chinese Hamster Cells
Treated with Sulfur Mustard and X-Rays
Cancer Research 28 (1968) 1150-1155
51. NITZE, H.R. und ROSEMAN, G.
Die Beeinflussung des Zellteilungsrythmus
bei menschlichen Tumoren
Arch. klin. exp. Ohr.- Nas.- und Kehlkopfheilkunde 193
(1969) 101-111
52. NITZE, H.R., GANZER, U., VOSTEEN, K.-H.
Die Strahlenbehandlung synchronisierter Tumoren
Sonderdruck aus Arch. klin. exp. Ohr.- Nas.-
und Kehlkopfheilkunde, Bd. 196 (1970)
Kongreßbericht Travemünde
53. PALME, G. und LISS, E.
Sensitivity of Different Drugs in the Cell Cycle
of Ascites Tumor Cells Under Influence of
Cyclophosphamide
Antimicrobial Agents and Chemotherapy (1965) 467-502
54. PFEIFFER, S.E. and TOLMACH, L.J.
Selecting Synchronous Populations of Mammalian Cells
Nature, Vol. 231 (1967) 139-142
55. PUTTEN van, L.M., LELIEVED, P., KRAM-IDSENGA, K.J.
Cell-Cycle Specificity and therapeutic
Effectiveness of Cytostatic Agents
Cancer Chemother. Rep. 56 (1972) 691-700

36. PÜTTER, J.

Über die biochemischen Wirkungen von Cytostatika
auf Tumorzellen

In Therapie maligner Tumoren Hämoblastome u.
Hämoblastosen, Bd. I, Ferdinand Enke Verlag
Stuttgart (1966) 80-146

37. RAJEWSKI, M.F., HÜLSER, D.F., FABRICIUS, E.

Untersuchungen zur Synchronisation in vivo:
Temporäre Inhibition der DNA-Synthese durch
Hydroxyharnstoff in normalen und malignen
Säugerzellsystemen
Z. Krebsforschung 76 (1971) 266-292

38. RAJEWSKI, M.F.

Synchronisation in vivo: Kinetics of a
Malignant Cell System Following Temporary
Inhibition of DNA-Synthesis with Hydroxy urea
Exp. Cell Research 60 (1970) 269-276

39. SCHINDLER, R., HÜRNI, C.

Synchrony of Long Duration in Suspension
Cultures of Mammalian Cells
Nature New Biology 234 (1971) 148-149

40. SCHINDLER, R.

Studies on the Division Cycle of Mammalian Cells
IV. DNA Polymerase Activities in Partially
Synchronous Suspension Cultures
Exp. Cell Research 71 (1972) 218-224

41. SCHMIDT, H.

Unterschiedliche Aufnahme zweier alkylierender
Cytostatika durch Ascites-Tumorzellen
Dissertation Berlin (1974)

42. SCHNEIDERMAN, M. H., DEWEY, W.C., HIGHFIELD, D.P.
Inhibition of DNA Synthesis in Synchronized
Chinese Hamster Cells Treated in G₁ with
Cycloheximide
Exp. Cell Research 67 (1971) 147-155
43. SINCLAIR, W.K. and MORTON, R.A.
X-Ray and Ultraviolet Sensitivity of
Synchronized Chinese Hamster Cells
at Various Stages of the Cell Cycle
Biophys. J. 5 (1965) 1-25
44. SINCLAIR, W.K.
Hydroxyurea: Differential Lethal Effect
on Cultured Mammalian Cells During the Cell Cycle
Science 150 (1965) 1729-1731
45. TERASIMA, T. and TOLMACH, L.J.
Variations in Several Responses of HeLa Cells
to X-Irradiation During the Division Cycle
Biophys. J. 3 (1963) 11-33
46. TOBEY, R.A.
A Simple Rapid Technique for Determination
of the Effects of Chemotherapeutic Agents
on Mammalian Cell Cycle Traverse
Cancer Research 32 (1972) 309-316
47. WARMSLEY, A.M.H., and PASTERNAK, C.A.
The Use of Conventional and Zonal Centrifugation
to Study the Life Cycle of Mammalian Cells
Phospholipid and Macromolecular Synthesis
in Neoplastic Mast Cells
Biochem. J. 119 (1970) 495-499

48. WARMSLEY, A.M.H., PHILLIPS, B., PASTERNAK, C.A.

The Use of Zonal Centrifugation to Study
Membrane Formation During the Life Cycle
of Mammalian Cells

Synthesis of Marker Enzymes and Other
Components of Cellular Organelles

Biochem. J. 120 (1970) 683-688

Lebenslauf

Name: Theresia Jungwirth
geb.: 5. 11. 1948 in Bretten/Baden.

Ausbildung: 1955 Eintritt in die Volksschule Flehingen,
Kreis Karlsruhe
1960 Aufnahme in das Math.-Naturwiss.
Melanchton-Gymnasium Bretten
1968 Abitur an dieser Schule
1968/69 Beginn des Medizinstudiums an der Freien
Universität Berlin
1972 Studium an der Universität Wien
1974 Staatsexamen an der Freien Universität
Berlin, Medizinalassistentenzeit im
Klinikum Westend der Freien Universität
Berlin, in der Landesnervenklinik Berlin
und im Klinikum Steglitz der Freien
Universität Berlin.

